

## EL «FENOMEN RESERPÍNIC» AL CONDUCTE DEFERENT \*

per

FRANCESC JANÉ, MARIA-EULÀLIA PLANAS i CARME PIÑA

Bé que utilitzada en terapèutica des de fa molt de temps com a constituent dels alcaloides de la *Rauwolfia serpentina*, com ho demostren els escrits de la vella cultura hindú, la reserpina no fou coneguda per la medicina occidental fins fa ben pocs anys (1951), i no fou utilitzada àmpliament en clínica, i, sobretot, en la investigació farmacològica, fins ben entrada la dècada dels 50.

Ben aviat hom pogué demostrar <sup>1, 3</sup> que la reserpina produïa els seus efectes farmacològics per la propietat que té aquest alcaloide de buidar els dipòsits que, en el sistema nerviós central i perifèric, emmagatzemen alguns importants neurotransmissors, com és ara la serotonina, la dopamina, l'adrenalina i la noradrenalina.

En l'aparell cardiovascular, tant de l'animal d'experimentació com de l'home, la reserpina produeix, i d'ací ve una de les seves aplicacions en terapèutica, un efecte hipotensor relativament suau i d'instauració lenta, però molt persistent. Aquest efecte podria ésser considerat sorprenent, tenint en compte que l'alcaloide allibera neurotransmissors, i en particular la noradrenalina, l'efecte dels quals és normalment hipertensor. Estudis experimentals,<sup>5, 6</sup> però, semblen poder explicar aquesta aparent contradicció. En efecte, el que allibera la reserpina de la terminació nerviosa no deu ésser en realitat la noradrenalina immodificada, sinó un metabòlit desaminat i oxidat, i per tant inactiu, d'aquella amina. Aquesta desaminació oxidativa pot ésser produïda per l'acció d'un enzim que es troba en l'interior dels mitocondris de la terminació nerviosa, la monoaminoxidasa. Per això no solament no es veuria, immediatament després de l'administració de la reserpina, un efecte hipertensor, sinó que quan els dipòsits fossin buits, en faltar el to vasoconstrictor normal, s'observaria

\* Aquest treball fou dut a terme en part mentre un de nosaltres (F. J.) gaudia d'una beca concedida per la «Fundación Juan March».

un efecte hipotensor. A l'efecte perifèric que acabem de descriure, s'hi podria sumar, en l'animal sencer, l'acció de la reserpina sobre el centre vasomotor hipotalàmic.<sup>9</sup>

VALDECASAS i col·lab.<sup>10</sup> feren per primera vegada l'observació que quan hom administrava a l'animal (gat) espinal amb registre de pressió arterial, abans de la reserpina, amfetamina o bé cocaïna, la injecció posterior de l'alcaloide no produïa el clàssic efecte hipotensor, sinó un augment intens i prolongat de la pressió arterial i una gran activitat espinal de tipus reflex. Els autors anomenaren el conjunt d'aquests fets «fenomen reserpínic» (FR).

Des d'aleshores, nombroses investigacions han demostrat que altres grups de substàncies, a més a més de les esmentades, poden provocar el FR. Entre elles hi ha amines amb acció simpaticomimètica indirecta com és ara l'efedrina, la mefentermina i la metamfetamina, inhibidors de la monoaminoxidasa com l'iproniacida, la tranilcipromina i la pargilina, la cocaïna i la guanetidina.

El fet que, com han demostrat diferents experiments, el FR pugui ésser bloquejat pels anomenats adrenolítics alfa, i també pel tractament previ de l'animal amb dosis adients de reserpina, i que, d'altra banda, no sigui modificat per l'adrenalectomia bilateral, la descentralització o l'administració prèvia d'antihistamínics o d'antiserotonínics, sembla indicar que els efectes observats poden ésser deguts a una modificació dels mecanismes adrenèrgics fisiològics.

Hom encara no coneix, però, quin és el mecanisme íntim pel qual es produeix aquesta modificació, ni tampoc si es tracta d'un mecanisme únic, o de diferents accions que poden conduir a un mateix efecte.

Amb l'objecte de contribuir a l'aclariment del problema, hom considerarà interessant de veure si aquesta interacció es podia manifestar d'alguna forma *in vitro*, és a dir, mitjançant la utilització d'un òrgan aïllat, car d'aquesta manera es podrien simplificar alguns factors que, en l'animal sencer, poden complicar la interpretació dels resultats.

#### MATERIALS I MÈTODES

Ha estat emprat com a òrgan aïllat el conducte deferent de rata, utilitzat ja en nombrosos experiments per nosaltres mateixos.<sup>4, 7</sup> A la facilitat del seu muntatge, aquest preparat presenta, com a avantatges més importants per als nostres objectius, ésser molt sensible enfront de diverses substàncies amb activitat simpàtica, i tenir un contingut elevat de noradrenalina.

Han estat emprats conductes deferents procedents de rates Wistar,

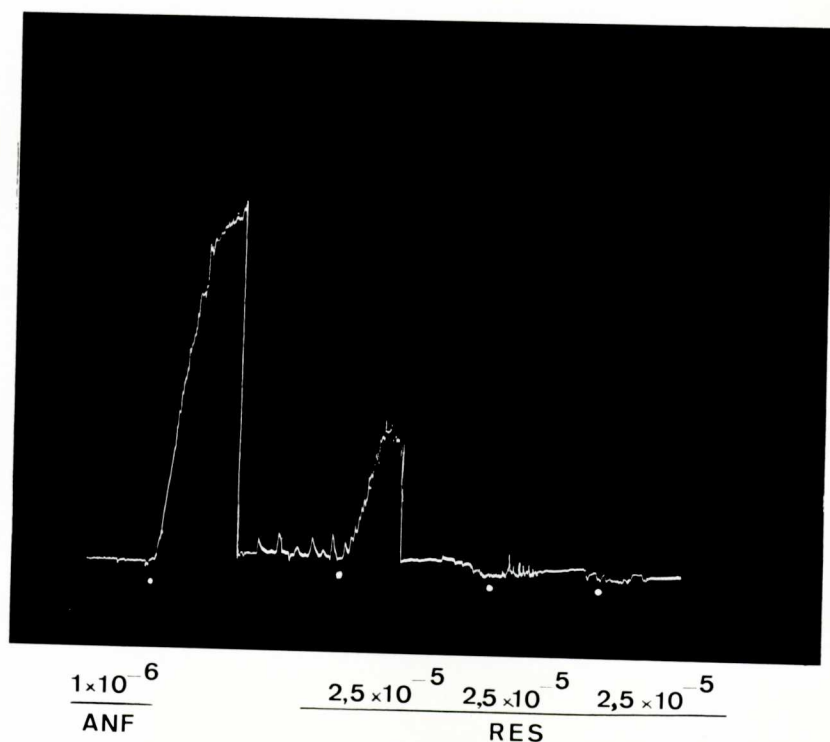


FIG. 1. — Conduite deferent aïllat de rata. Després de l'estimulació del preparat amb amfetamina (ANF), la reserpina (RES) provoca una resposta contràctil de l'òrgan. Les dosis de reserpina afegides posteriorment no provoquen cap resposta. Concentracions expressades en g/ml.

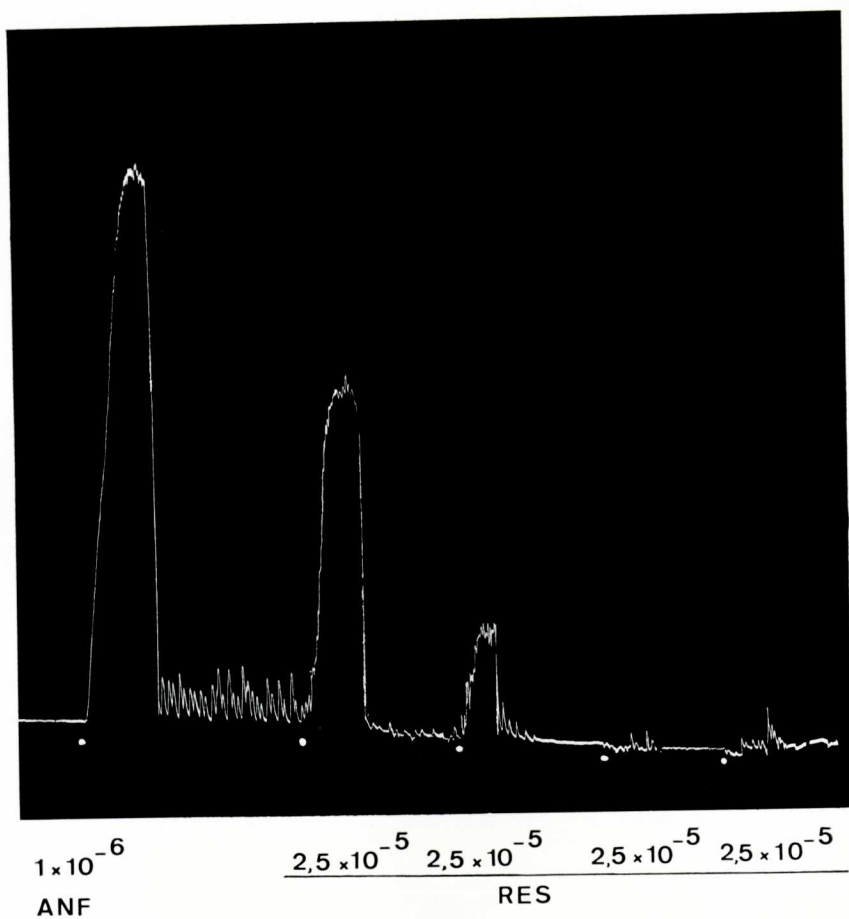


FIG. 2. — Conduite deferent aïllat de rata. Després de l'estimulació del preparat amb amfetamina (ANF), la reserpina (RES) provoca dues vegades una resposta contràctil de l'òrgan. Concentracions expressades en g/ml.

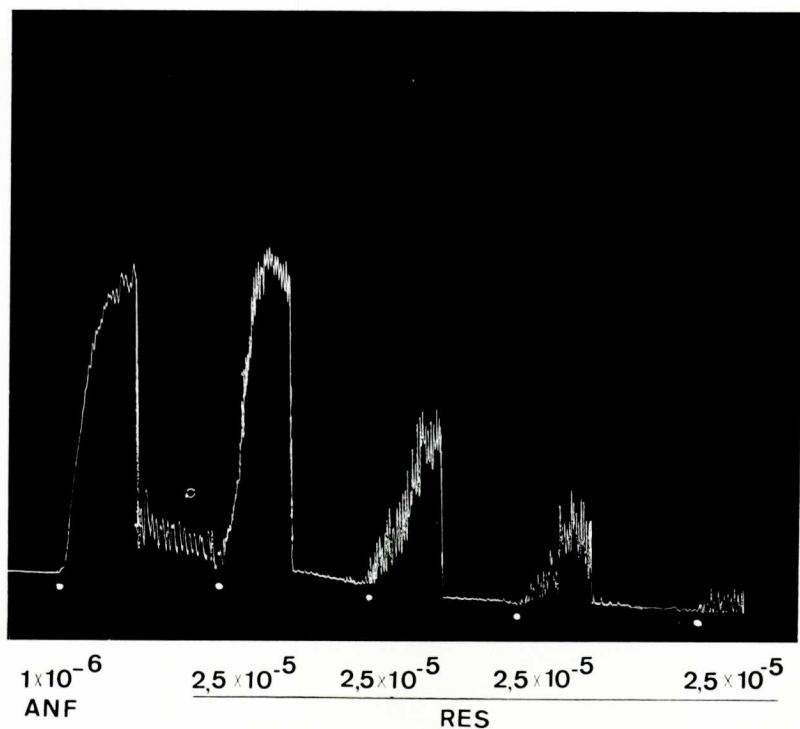


FIG. 3. — Conduite deferent aïllat de rata. Després de l'estimulació del preparat amb amfetamina (ANF), la reserpina (RES) provoca tres vegades una resposta contràctil de l'òrgan. Concentracions expressades en g/ml.

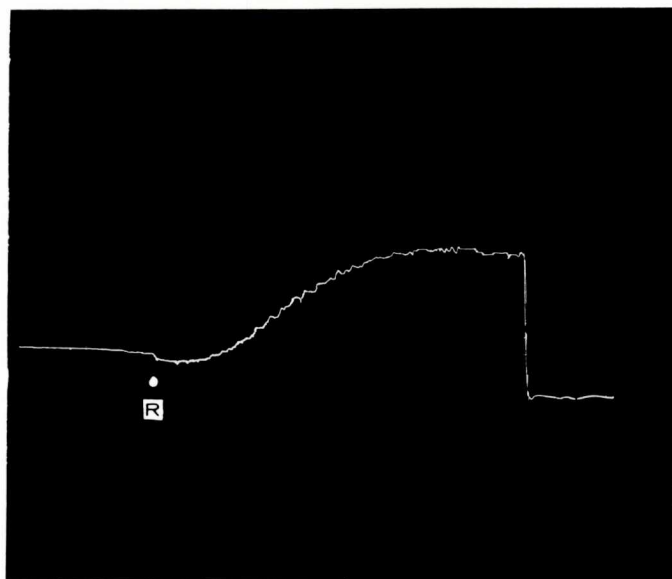


FIG. 4. — Conduite deferent aïllat de rata, tractada una hora abans del sacrifici de l'animal amb 2,5 mg/kg d'amfetamina per via intraperitoneal. Resposta a la reserpina (R), a una concentració de  $2,5 \times 10^{-6}$  g/ml.

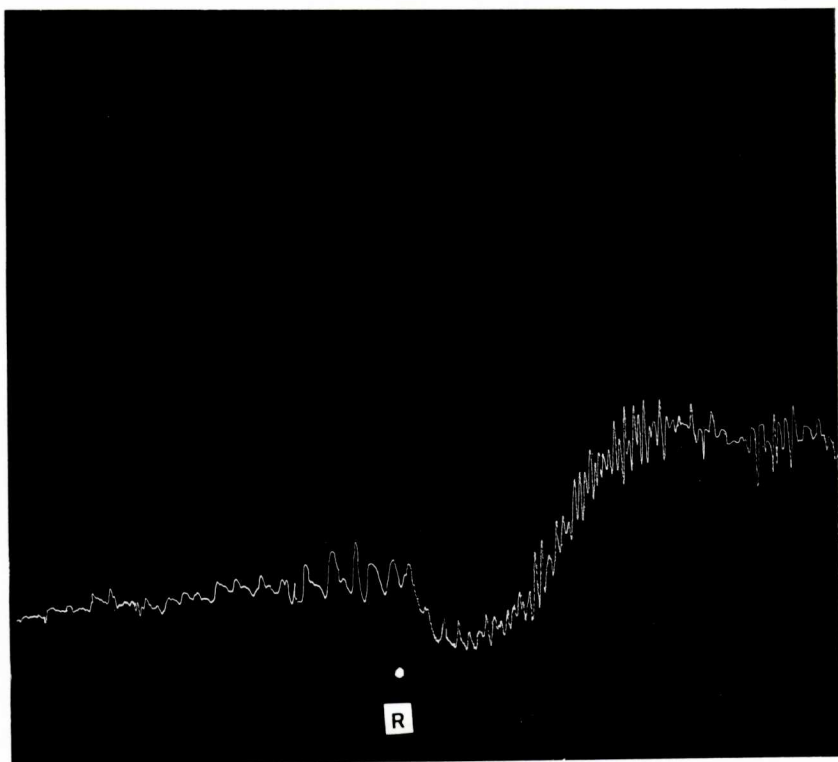


FIG. 5. — Conduite deferent aïllat de rata, tractada una hora abans del sacrifici de l'animal amb 1 mg/kg de tranilcipromina per via intraperitoneal. Resposta a la reserpina (R), a una concentració de  $2,5 \times 10^{-5}$  g/ml.

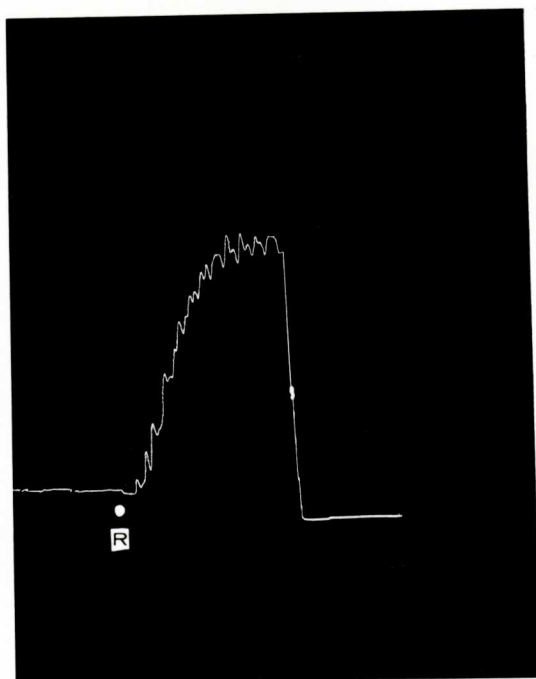


FIG. 6. — Conduite deferent aïllat de rata, tractada 18 hores abans del sacrifici de l'animal amb 100 mg/kg d'iproniàcida per via intraperitoneal. Resposta a la reserpina (R), a una concentració de  $2,5 \times 10^{-5}$  g/ml.

d'un pes aproximat de 200 g. Després del sacrifici de l'animal i de la dissecció de l'òrgan, aquest és muntat en un bany d'òrgan aïllat, de 10 ml de capacitat, en el qual hi ha líquid nutrici de Krebs mantingut a una temperatura constant de 31° C i gasificat amb carbogen (95 % d'oxigen i 5 % d'anhidrid carbònic). Les contraccions del preparat són registrades per mitjà d'una palanca d'inscripció frontal que registra els moviments en un paper fumat muntat en un quimògraf, amb una amplificació de 6-8 vegades.

Les substàncies a assajar són afegides al bany en els temps indicats i hom registra les modificacions observades, després de la qual cosa el preparat és rentat mitjançant el drenatge del líquid nutrici i posterior emplenament amb líquid nou. Si hi ha hagut una contracció, el preparat torna aleshores a la seva posició inicial. Les concentracions de les substàncies afegides són expressades d'acord amb la concentració final en el bany (en g/ml) referida a la substància base.

Quan les substàncies han estat administrades a l'animal *in vivo*, ho han estat per mitjà de la injecció intraperitoneal en els temps indicats abans del sacrifici, i les dosis es refereixen també a la substància base.

Han estat emprades les següents substàncies: DL-amfetamina sulfat (Miquel), efedrina hidroclore (Fluka), iproniacida hidroclore (Roche), noradrenalina bitartrat (Fluka), pargilina hidroclore (Abbott), reserpina (Serpasol® Ciba), tiramina hidroclore (Fluka) i tranilcipromina hidroclore (SK & F).

## RESULTATS I DISCUSSIÓ

La reserpina, quan és afegida al bany fins a concentracions de  $3 \times 10^{-4}$  g/ml, no produeix cap efecte observable. Tampoc no podem veure cap efecte de l'alcaloide quan és afegit al bany després d'haver estimulat el preparat una sola vegada o repetidament amb diferents dosis de noradrenalina o bé de tiramina.

Si, però, la reserpina és afegida al bany quan l'òrgan ha estat prèviament estimulat amb una sola dosi (fig. 1) o amb diferents dosis d'amfetamina, llavors l'alcaloide produeix una resposta contràctil del preparat, quasi sempre lenta i irregular. Generalment, la resposta a la reserpina és única, és a dir, pot ésser vista només una vegada després de l'estimulació del preparat, però en diferents experiments han pogut ésser observades dues (fig. 2) i fins i tot tres (fig. 3) respostes successives a l'afegit al bany de les corresponents dosis de reserpina. Assenyalem aquest fet, perquè en l'animal sencer hom ha dit que el FR es podia produir només una sola vegada, o sia, que la resposta hipertensiva només podia ésser



vista amb la primera dosi de reserpina, observació, però, que no ha estat suficientment comprovada.

En un treball ja publicat<sup>8</sup> poguérem demostrar que aquesta interacció en el conducte deferent era quantitativament i, fins a un cert punt, proporcional a les dosis d'amfetamina i de reserpina utilitzades. Els resultats obtinguts són expressats en la taula I.

En aquesta taula veiem com, en cadascuna de les tres dosis d'amfetamina utilitzades, la resposta a les dosis creixents de reserpina van augmentant fins a arribar a un màxim amb  $2,5 \times 10^{-5}$  g/ml, després del qual la resposta és decreixent fins a ésser nul·la amb una concentració de l'alcaloi-de de  $1 \times 10^{-4}$  g/ml. És possible que aquesta última concentració de la reserpina pugui desenvolupar un efecte adrenolític alfa o un efecte ines-

Reserpina (g/ml)

Amfetamina (g/ml)							
		$1 \times 10^{-6}$	$5 \times 10^{-6}$	$1 \times 10^{-5}$	$2,5 \times 10^{-5}$	$5 \times 10^{-5}$	$1 \times 10^{-4}$
	$2,5 \times 10^{-7}$ $12,9 \pm 2,7$ (63)	0 (10)	$0,7 \pm 0,7$ (10)	$1,8 \pm 0,6$ (12)	$9,7 \pm 2,8$ (10)	$0,5 \pm 0,3$ (11)	0 (10)
	$5 \times 10^{-7}$ $39 \pm 10,7$ (42)	0 (8)	$7,2 \pm 1$ (5)	$9,1 \pm 2$ (6)	$14 \pm 2,8$ (7)	$9,1 \pm 2$ (8)	0 (8)
	$1 \times 10^{-6}$ $48,9 \pm 8,4$ (54)	0 (9)	$7,8 \pm 1,8$ (8)	$11,1 \pm 2,5$ (7)	$20,6 \pm 2,6$ (10)	$6,5 \pm 1,9$ (10)	0 (10)

TAULA I. — Conducte deferent aïllat de rata. Estudi quantitatiu de la interacció entre amfetamina i reserpina. A cadascuna de les concentracions emprades d'amfetamina (columna de l'esquerra) en correspon una de reserpina. En cada experiment ha estat aplicada només una dosi d'amfetamina i una dosi de reserpina. Les altures de les contraccions obtingudes són expressades en mm  $\pm$  l'error *standard* de la mitjana. Entre parèntesis són expressats el nombre d'experiments. Per a més detalls, vegeu el text.

pecífic que inhibeixi la resposta. Observeu, tanmateix, com la resposta a la reserpina és aproximadament proporcional a les concentracions d'amfetamina emprades per nosaltres. La resposta a l'amfetamina del preparat és molt variable, àdhuc amb les condicions experimentals acuradament controlades, la qual cosa explica el gran nombre d'experiments que hem dut a terme.

L'estimulació prèvia del preparat amb una dosi única o amb dosis repetides d'efedrina, simpaticomimètic indirecte de característiques semblants a l'amfetamina, fa que l'afegit de reserpina al bany provoqui també



una resposta contràtil. Igual s'esdevé després de l'addició prèvia de tranilcipromina, substància que té a la vegada efectes simpaticomimètics indirectes i inhibidors de la monoaminooxidasa.

Per contra, en les condicions experimentals emprades, hom no observa cap resposta a l'alcaloide quan prèviament han estat afegits al bany, a temps (de 5 a 60 minuts) i dosis (de  $5 \times 10^{-6}$  g/ml a  $1 \times 10^{-4}$  g/ml) variables, els inhibidors de la monoaminooxidasa, iproniacida i pargilina.

Hom pot també observar una resposta contràtil del conducte deferent aïllat en ésser afegida reserpina al bany, quan l'animal ha estat prèviament tractat *in vivo* amb una dosi d'amfetamina de 2,5 mg/kg intraperitoneal, una hora abans del sacrifici de l'animal (fig. 4), o d'efedrina, en les mateixes condicions, o amb tranilcipromina, 1 mg/kg intraperitoneal també una hora abans del sacrifici (fig. 5). És característica, després de l'administració de tranilcipromina tant *in vivo* com *in vitro*, l'observació d'una marcada motilitat espontània del preparat, que normalment no presenta moviments espontanis. La resposta contràtil del preparat a la reserpina es posa també de manifest quan l'animal és tractat *in vivo* amb iproniacida. Amb aquest inhibidor de la monoaminooxidasa, però, són crítics tant la dosi emprada com el temps entre l'administració i el sacrifici de l'animal. En efecte, hem pogut observar una resposta contràtil després d'afegir reserpina al bany quan l'animal ha estat tractat *in vivo*, 10 hores abans del sacrifici, amb 100 mg/kg d'iproniacida per via intraperitoneal (fig. 6). Dosis inferiors a l'esmentada, o administrades en un lapse inferior a les 18 hores, produeixen un efecte molt poc marcat, o no en produeixen. Això també passa quan les dosis i els temps són superiors als esmentats.

En les nostres condicions experimentals, la pargilina, administrada en qualsevol temps i dosi abans de la reserpina, no provoca cap acció observable en el conducte deferent aïllat després de l'afegit de l'alcaloide al bany.

Els nostres resultats semblen demostrar, doncs, que en el conducte deferent *in vitro* és possible d'obtenir una resposta quan hom afegeix reserpina al bany, si el preparat ha estat prèviament estimulat, o bé l'animal pretractat *in vivo*, amb determinades substàncies.

Ara bé: ¿es possible de dir que aquesta resposta pot ésser comparada a allò que en l'animal sencer hem anomenat «fenomen reserpínic»? O encara més: es tracta del mateix efecte? La resposta sembla que ha d'ésser, a la llum dels nostres resultats, afirmativa, almenys en part. En primer lloc, les substàncies que provoquen el FR *in vivo*, ho fan també en el preparat *in vitro*, si exceptuem la pargilina, que el provoca en l'animal sencer amb registre de la pressió arterial,<sup>2</sup> però no *in vitro*, en les nostres condicions experimentals. Tampoc no és observat quan la

iproniacida és afegida al bany d'òrgan aïllat abans de la reserpina però sí, per contra, quan l'inhibidor de la monoaminooxidasa és administrat *in vivo*, a dosis i temps determinats; és possible que també fos aconseguit si hom dugués a terme una incubació adequadament llarga amb l'inhibidor *in vitro*. I potser també amb una administració crònica de pargilina *in vivo*. Ambdues possibilitats són actualment estudiades.

En segon lloc, hem pogut demostrar que, igual que s'esdevé *in vivo*, la resposta contràctil a la reserpina pot ésser bloquejada en el conducte deferent aïllat quan l'animal ha estat tractat prèviament amb reserpina (1 a 2,5 mg/kg per via intraperitoneal, 24 hores abans del sacrifici); és a dir, quan pràcticament és zero la noradrenalina que hi ha en l'òrgan. I també quan, abans de la reserpina, i després d'haver estimulat el preparat amb les substàncies que poden provocar la resposta contràctil a l'alcaloide, hom afegeix al bany un bloquejant adrenèrgic de tipus alfa (per exemple, fentolamina,  $5 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-6}$  g/ml).

En experiments en curs, els resultats dels quals presentarem més endavant a aquesta Societat, investiguem quin mecanisme o quins mecanismes poden participar en el desenvolupament d'aquesta resposta, i en particular la possible inhibició de la monoaminooxidasa.

Els autors agraeixen el forniment de les substàncies emprades en els seus experiments, per part dels següents Laboratoris: Abbott (pargilina hidroclore), Ciba (Serpasol®), Miquel (amfetamina sulfat), Roche (iproniacida hidroclore) i Smith, Kline & French (tranilcipromina hidroclore).

#### BIBLIOGRAFIA

1. CARLSSON, A., ROSENGREN, E., BERTLER, A., i NILSSON, J. — *Effect of reserpine on the metabolism of catecholamines*. A: «Psychotropic drugs». Ed. per S. Garattini i V. Ghetti, pp. 363-372. Elsevier Publ. Co. Amsterdam, 1957.
2. CHOPRA, Y. N., i DANDIYA, P. C. — *On the mechanism of reversal of reserpine action by pargiline hydrochloride*. «Arch. int. Pharmacodyn.», 181: 47-56, 1969.
3. HOLZBAUER, M., i VOGT, M. — *Depression by reserpine of the noradrenaline concentration in hypothalamus of the cat*. «J. Neurochem.», 1: 8-11, 1956.
4. JANÉ, F. — *El conducto deferente como reactivo farmacológico*. Tesis Doctoral. Barcelona, 1970.
5. KOPIN, I. J., i GORDON, E. K. — *Metabolism of norepinephrine- $H^3$  released by tyramine and reserpine*. «J. Pharmac. exp. Ther.», 138: 351-359, 1962 (a).
6. KOPIN, I. J., i GORDON, E. K. — *Metabolism of administered and drug released norepinephrine- $7-H^3$  in the rat*. «J. Pharmac. exp. Ther.», 140: 207-216, 1963 (b).
7. LAPORTE, J., i JANÉ, F. — *Estudis dels mecanismes adrenèrgics en el conducte deferent*. «Treballs de la Societat Catalana de Biologia», 22: 67-71, 1967.
8. LAPORTE, J., JANÉ, F., CUENCA, E., RODRÍGUEZ, L., i VALDECASAS, F. G. — *Interactions between amphetamine and reserpine in vitro*. «Experientia», 25: 1161-1162, 1969.
9. SALVÀ, J. A. — *Veratrum et Rauwolfia: étude de pharmacologie comparée*. «Actualités Pharmacol.», 8: 153-176, 1955.
10. VALDECASAS, F. G., SALVÀ, J. A., i CUENCA, E. — *Effect of reserpine on the blood pressure of spinal cat treated with inhibitors of amino-oxidase*. «Arzneim.-Forsch.», 8: 655-656, 1958.